

**Análisis Exploratorio de datos para desarrollar propuestas de conservación de la comunidad de Anfibios referentes al *Batrachochytrium dendrobatidis* en el Parque Nacional Cajas, Cuenca-Ecuador.**

Jose F. Cáceres-Andrade

Programa de Biodiversidad, Parque Nacional Cajas, Subgerencia de Gestión Ambiental, ETAPA EP.  
Cuenca-Ecuador

---

***Resumen***

Los anfibios son uno de los grupos mayormente amenazados con la extinción a nivel mundial, incluso en áreas protegidas o de conservación. No se sabe a ciencia cierta cuál es el factor principal que produce la declinación o si varios de ellos actúan y cómo en cada caso. Uno de los principales, es la aparición de enfermedades emergentes que han sido responsables de extinciones en varias zonas del planeta. Con este estudio se plantea relacionar la altitud, la posición geográfica y nueve especies registradas en el Parque Nacional Cajas (Azuay, Ecuador) con los registros de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

***Abstract***

Amphibians are one of the most endangered species worldwide, even in protected or conservation areas. No one knows for sure what is the main factor that causes the decline or if several factors act and how in each case. One of the main ones is the occurrence of emerging diseases which have been responsible for extinction in several areas of the planet. With this study it is intended to link altitude, geographical position and the nine species registered in *Cajas* National Park (Azuay, Ecuador) with records of *Batrachochytrium dendrobatidis*

## Introducción

Los anfibios son un grupo bioindicador muy confiable de los procesos que están ocurriendo en el medio ambiente. Sus dos fases vitales bien diferenciadas, una larvaria acuática y otra adulta terrestre; sus cortos desplazamientos y escasa capacidad de dispersarse; su alta dependencia a los hábitats que ocupan; su poca plasticidad de adaptación a los cambios, potenciados en gran medida por el ser humano, etc., les hacen sufrir con mayor severidad las reducciones de sus poblaciones.

Actualmente los anfibios son uno de los grupos con mayores problemas de conservación. La declinación que se ha dado en muchas poblaciones a nivel mundial, inclusive en hábitats aparentemente prístinos, ha llevado a los investigadores en herpetología a mostrarse de acuerdo con la inminente necesidad de buscar respuestas a temas relacionados a la biología, ecología y conservación de este grupo.

Esta declinación global de anfibios, constituye un proceso muy complejo de dimensionar y evaluar, en especial en países como Ecuador por ser uno de los países con mayor riqueza de especies, en donde gran parte del estado de sus poblaciones es desconocido. Por otro lado, de las especies descritas en el país, un gran porcentaje (43%) cuenta con algún grado de amenaza, un alarmante 27% está dentro de la categoría de Datos Insuficientes (DD) (Coloma *et al.* 2011/2012) y muchas de ellas se consideran extintas o no se han vuelto a reportar en varios años, sin que se precise una causa.

Sin embargo, es realmente muy difícil determinar las causas estrictas de esta amenaza, pero es posible que responda a factores que, actuando solos o en combinación, podrían explicar esta situación. Para mostrar conclusiones certeras habría que desarrollar estudios de detalle, tanto a nivel específico como territorial. De esta forma, investigaciones sistemáticas y mantenidas en el tiempo, permitirían obtener una información precisa y fiable de los procesos vitales, ecológicos y territoriales que afectan a cada una de las especies o grupos.

La primera evaluación global de anfibios proporciona un contexto nuevo para el fenómeno de las declinaciones de anfibios. (Stuart, S. *et al.* 2004) Están más amenazados y están disminuyendo más rápidamente que las aves o los mamíferos. Los descensos son aleatorios en cuanto a las preferencias ecológicas de las especies, áreas geográficas y asociaciones taxonómicas y son más frecuentes en bosques montanos neotropicales, y especies asociadas a arroyos. La falta de

recursos para la investigación de estos descensos poco conocidos significa que cientos de especies de anfibios se enfrentan a la extinción.

A pesar de que se ha determinado que la destrucción del hábitat es el factor principal que afecta a los anfibios, existen otros como la aparición de las llamadas enfermedades emergentes, dentro de las cuales el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* ha desempeñado un papel importante en las especies que anteriormente eran comunes, y que ahora se encuentran al borde de la extinción. Estos efectos son bastante recientes, posiblemente dentro de los últimos 30 años.

El *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) es un hongo patógeno que afecta a los anfibios, responsable de la quitridiomycosis que se ha constituido en uno de los factores que han contribuido a la declinación de este grupo en el mundo entero. El Bd es un tipo de hongo queratinófilo que tiene dos etapas de vida, una como zoospora móvil y otra como un esporangio sésil que se puede implantar en la piel de los anfibios. Para poder infectar a un anfibio, el Bd debe traspasar el mucus defensivo de su piel que contiene péptidos antimicrobianos y bacterias simbióticas, y los linfocitos de los tejidos (Rollins-Smith, *et al.* 2011). El Bd forma esporangios en las células de la epidermis y puede parasitar algunas capas profundas. El desarrollo del esporangio coincide con la maduración de las células del anfibio, de manera que las células se mueven hacia afuera y la queratinización ocurre justo cuando las zoosporas están listas para ser liberadas (Berger *et al.*, 2005). Los síntomas de la quitridiomycosis incluyen desprendimiento de la piel, letargo, y reflejos pobres (Pessier, 1999). La susceptibilidad a la quitridiomycosis puede variar mucho de acuerdo a la especie de anfibio.

### **Descripción del Bd**

El *Batrachochytrium dendrobatidis* (Fungi: Chytridiomycota: Chytridiomycetes: Rhizophydiales, cedis incertae: *Batrachochytrium dendrobatidis*), comúnmente llamado quítrido de los anfibios o Bd, vive en las células queratinizadas de las capas superficiales (estrato córneo y estrato granuloso) de la epidermis de los anfibios (Figura1). Los quítridos son únicos dentro de los hongos porque tienen una zoospora flagelada; y el Bd es único entre los quítridos porque parasita a un vertebrado. El Bd es diploide y se reproduce de manera asexual. Tiene dos fases de vida (Figura1), un zoosporangio sésil y una zoospora móvil. El zoosporangio tiene una forma subsférica o esférica, que varían de tamaño entre los 10-40  $\mu\text{m}$  de diámetro y tiene rizoides filiformes. Produce

un solo tubo de descarga que sobresale de la piel y sirve para dispersar las zoosporas (Figura1). Las zoosporas tienen de 0.7 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, y una forma ovoide o elongada, además de un singular flagelo posterior para la movilidad en el agua (Longcore *et al.* 1999), las zoosporas tienen de uno a dos días para encontrar un hospedero antes de morir (Piotrowski *et al.* 2001, Woodhams *et al.* 2008).

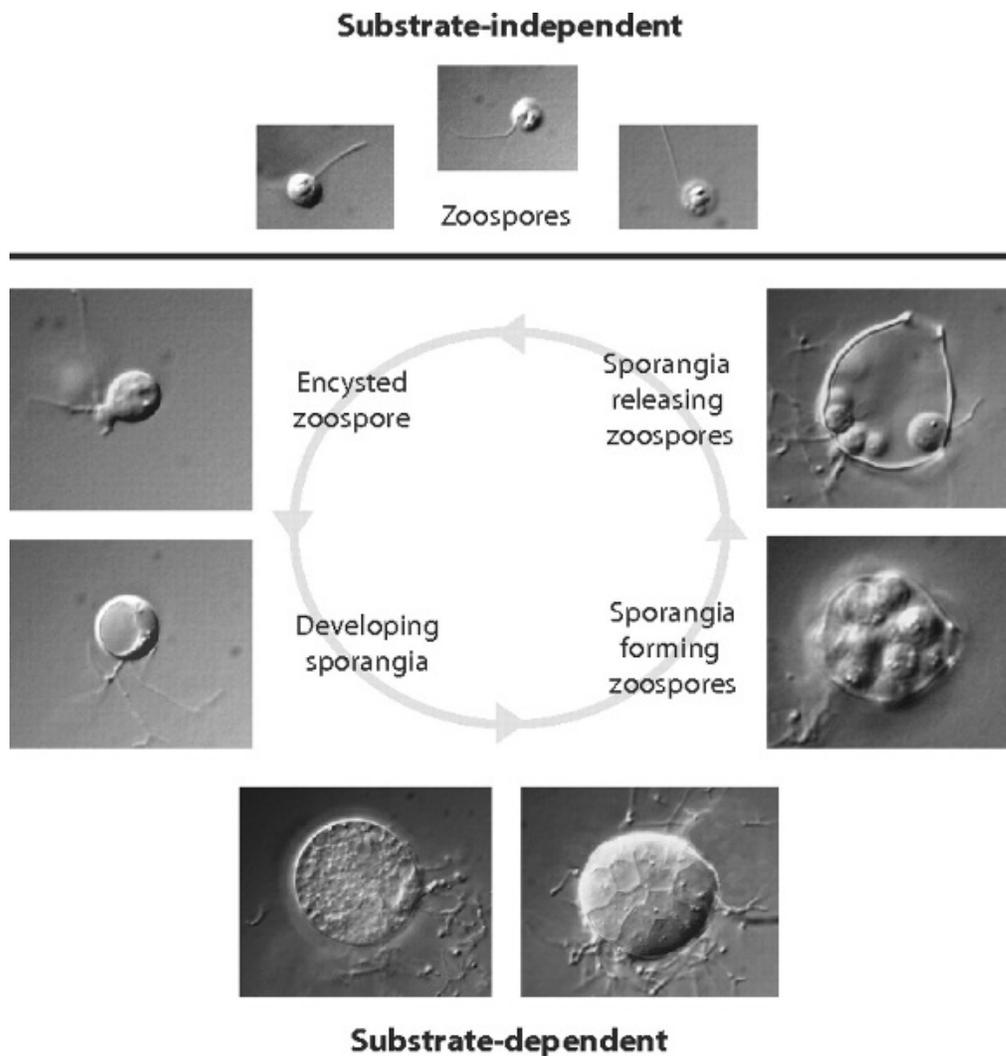


Fig. 1. El ciclo de vida de Bd. En la parte de sustrato independiente de la etapa de la vida, zoosporas flageladas son móviles y de vida libre. En la parte de sustrato dependiente del ciclo de vida, las zoosporas se enquistan y se transforman en zoosporangios, que producen y liberan nuevas zoosporas. (PNAS. 2014)

## **Impacto General del Bd en las comunidades de Anfibios**

El *Batrachochytrium dendrobatidis* fue el primero en ser reconocido como una causa de la disminución de anfibios en 1997. (Pessier, *et al.* 1999). La quitridiomycosis, la enfermedad de los anfibios asociada a Bd, se ha implicado en la disminución de anfibios a nivel mundial (Kiesecker 2011, Blaustein y Johnson 2010). Sobre la introducción, el nuevo agente patógeno ha causado disminuciones graves y en algunos casos extirpaciones o extinciones localizadas (Morgan *et al.*, 2007. James *et al.* 2009).

Los hábitats montanos tropicales son los preferidos para el Bd para su supervivencia y persistencia y porque estas son áreas de alta biodiversidad de anfibios, la enfermedad ha tenido efectos devastadores en estas áreas. (Wake *et al.* 2008).

La prevalencia del Bd puede variar en una población de 0 -100% de individuos infectados (Rosenblum *et al.* 2010), existen diferentes intensidades de infección en diferentes especies, desde asintomáticos hasta muertos en pocas semanas (Kilpatrick. 2009), y los individuos dentro de cada especie varían en su susceptibilidad (Rosenblum *et al.* 2010).

La quitridiomycosis impacta especialmente a poblaciones que previamente han sido impactadas por otros factores como el incremento en las radiaciones UV, otras enfermedades y cambios en los patrones climáticos (Wake, *et al.* 2008). Algunas poblaciones se han recuperado y persisten con infecciones endémicas (Blaustein *et al.* 2010; Kriger and Hero 2006, Retallick *et al.*, 2004, Lampo *et al.* 2012). Existe alguna evidencia de que la presión de selección altera a ciertas poblaciones de anfibios, favoreciendo a los individuos con las más fuertes defensas inmunológicas contra el Bd, las que incluyen péptidos antimicrobianos en la piel, anticuerpos mucosos, factores complementarios y la participación de los receptores de citosinas (Richmond *et al.* 2009).

Los síntomas de la quitridiomycosis incluyen, letargo, frecuente desprendimiento de la piel y una inhibición de los reflejos de enderezamiento (Pessier 2002), con Bd, los animales finalmente mueren por fallas en el corazón (Voyles *et al.* 2007).

El *Batrachochytrium dendrobatidis* puede tolerar amplios rangos de temperaturas (Woodhams, *et al.* 2008). Rangos de temperatura entre 4ª 28 °C son apropiados para el crecimiento y desarrollo del hongo (Piotrowski, *et al.* 2004, Woodhams, *et al.* 2003). El crecimiento por lo general se hace más lento por debajo de los 10°C y sobre los 25°C y se detiene a los 28°C. Así mismo, el

crecimiento óptimo se da entre los 17 a los 25°C (Piotrowski *et al.* 2004). con un mayor desarrollo de las zoosporas implantadas que ocurre a los 23°C (Longcore *et al.* 1999, Bradley. 2002). El Bd puede sobrevivir en hospederos que habitan charcas que alcanzan temperaturas de congelación (Seimon *et al.* 2006). A temperaturas bajas (alrededor de 10°C) produce más zoosporas por esporangio y éstas viven mayor tiempo (Woodhams, *et al.* 2008). Sin embargo cuando las temperaturas son bajas y el crecimiento es más lento, el Bd puede resistir en el ambiente. De acuerdo al aumento de temperatura, el promedio de mortalidad del Bd también se incrementa (Piotrowski, *et al.* 2004). A pesar de esto, las temperaturas en el límite superior del rango no son relevantes en los sistemas naturales. A los 23°C hay una amplia tasa de enquistamiento de zoosporas y un tiempo menos desde el enquistamiento a la esporulación. Mientras tanto a los 10°C, la mortalidad de las zoosporas decrece y el número de zoosporas viables producidas por cada esporangio es mayor la combinación de estos factores de temperatura, resulta en una muy crecimiento de la población de Bd a 23°C que a 10°C. En resumen, estas pruebas de laboratorio, indican que el Bd puede mantener, relativamente elevada, su tasa de crecimiento y desarrollo dentro del rango de temperatura comúnmente experimentado por los anfibios (Woodhams, *et al.* 2008).

#### **PROBLEMÁTICA:**

En la década de los 80`s se hicieron los primeros reportes de disminución de especies y poblaciones de anfibios, indicando la problemática mundial del declive de los anfibios en el mundo. (Alford y Richards *et al.* 1999; Young *et al.* 2001; Lips *et al.* 2005)

Aún no existe una explicación clara y completa sobre el origen de estas desapariciones, ya que los estudios que se requieren en el monitoreo y el control deben ser intensos y presentan dificultades. La evidencia señala que las desapariciones de especies anfibias se han dado tanto en zonas intervenidas por el ser humano como en áreas protegidas para la conservación. (Pounds y Crump, 1994; La Marca *et al.* 2005; Acosta-Galvis *et al.* 2006)

Varios factores pueden ser la causas para el riesgo en el que se encuentran los anfibios en el mundo y aparentemente, en muchos casos su interacción. Estos pueden variar desde la destrucción y fragmentación de hábitats, la radiación ultravioleta, los químicos utilizados, las alteraciones de las variables climáticas y los períodos, la introducción de especies exóticas y las

enfermedades infecciosas emergentes (*Ranavirus*, y los hongos del género *Saprolegnia* y el *Batrachochytrium dendrobatidis*, entre otros).

Las áreas protegidas no son una excepción de este fenómeno de declive y mucho más cuando hablamos de ecosistemas altoandinos como los presentes en el Parque Nacional Cajas, con procesos evolutivos exclusivos y especies endémicas como el caso de *Atelopus exiguus* y *Atelopus nanay*, así como otras importantes de las cuáles aún no se tiene siquiera certeza taxonómica en especial del género *Pristimantis*.

En el Parque Nacional Cajas se ha reportado la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* y de hongos del género *Saprolegnia* y así mismo declives de las poblaciones de algunas especies anfibias. Aún no existe un estudio que nos demuestre cómo y cuáles pueden ser los factores principales que están causando este fenómeno.

## **Metodología**

El Parque Nacional Cajas (PNC) se encuentra en el flanco occidental de la cordillera de los Andes, al sur del Ecuador, tiene una superficie de 28.544 has y está entre los 3150 hasta los 4450 msnm, lo que marca interesantes diferencias en los elementos que conforman el entorno natural del parque, manifestándose en la conformación topográfica, el tipo de suelo, la pendiente, en las temperaturas y precipitaciones, en las comunidades vegetales y animales de cada lugar.

Cuenta con un importante sistema lacustre que actúa en conjunto con las diferentes variedades de cobertura vegetal como esponjas reguladoras del agua, aportando a las cuencas y caudales de los ríos Tomebamba, Mazán, Yanuncay, Machágara, Migüir y beneficiando a la ciudad de Cuenca con el abastecimiento de agua potable y al país con energía eléctrica.

Dentro del PNC y sus áreas adyacentes, existe una importante muestra de la diversidad de fauna anfibia de los Andes del Ecuador, en donde se han registrado 12 especies pertenecientes a 6 familias (Coloma *et al.* 2011/2012); o 17 especies de 7 familias (Arbeláez, Vega. 2008). Los descubrimientos que se han realizado en áreas que no se habían evaluado desde el punto de vista herpetológico, reflejan el importante valor de la diversidad biológica del Cajas.

El parque acoge a las dos aparentemente únicas especies sobrevivientes de Ranas Arlequín de altura (*Atelopus exiguus*, *A. nanay*) en el país y posiblemente en el mundo. Recientemente, en septiembre de 2007, se encontraron a dos nuevas especies de anfibios para el parque, *Pristimantis vidua* y *P. philipi* (Arbeláez, Vega. 2008) y se está evaluando la posibilidad de nuevos registros o nuevas especies del mismo género para el parque.

Durante el año 2010 se elaboró el Plan de Diagnóstico, Rescate y Manejo de Anfibios que se comenzó a ejecutar en el 2011 con el monitoreo sistemático de anfibios en las 12 microcuencas del PNC, a través de métodos estandarizados VES (Visual encounter Survey) y AST (Audio Strip Transect) en transectos de banda de 50m x2m en recorridos totales de 3km.

Para el análisis de detección del Quítrido, en el laboratorio de la Universidad Tecnológica Indoamérica, se trabajó bajo los protocolos para el diagnóstico de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en las muestras de anfibios del Parque Nacional Cajas (PNC 001–261), y se realizaron reacciones en cadena de polimeraza (PCR) con los primers desarrollados por Annis *et al.* (2004) (Tabla 1.)

**Tabla 1.** Primers utilizados para la amplificación de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

<i>Nombre del primer</i>	<i>Secuencia</i>
Bd1a	CAGTGTGCCATATGTCACG
Bd2a	CATGGTTCATATCTGTCCAG

La PCR se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Goka *et al.* (2001). Las bandas resultantes fueron visualizadas en un gel de agarosa.

#### **DISEÑO DEL MUESTREO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS:**

Para el muestreo, y de acuerdo al Plan de Anfibios del PNC, se tomaron sitios claves en donde, por sus condiciones de humedad, vegetación, cuerpos de agua, etc., se pueden encontrar varias especies. Se escogieron 14 localidades dentro del Parque Nacional Cajas a ambos lados de la cordillera a las vertientes Pacífica y Atlántica.

Como los anfibios presentan una distribución irregular, de forma particular en hábitats complejos, es necesario tomar datos standard que permitan la aplicación de tratamientos estadísticos.

Los métodos utilizados para el muestreo son estandarizados de acuerdo a los protocolos (Angulo, *et al.* 2006, Heyer, *et al.* 1994) y tal como se recomienda en la bibliografía y en base a experiencia personal, es necesario combinarlos para poder obtener la mayor cantidad de información y de la mejor calidad posible.

Para este caso particular, lo mejor era una combinación de Relevamientos por Encuentros Visuales (VES) y Transectos de banda, los cuales describo a continuación.

#### **Relevamientos por encuentros visuales, (VES)**

Nos permite obtener información sobre la abundancia relativa de les especies de anfibios, se necesita invertir poco tiempo, poco dinero y no mucho personal.

En la técnica de relevamiento por encuentros visuales (Visual Encounter Survey), una persona camina a través de un área o hábitat por un período de tiempo predeterminado buscando animales de modo sistemático. El tiempo se expresa como el número de horas/ hombre de búsqueda en cada una de las áreas a comparar. Es una técnica apropiada tanto para estudios de inventario como de monitoreo.

#### **Transectos de Banda**

El muestreo de transectos en banda registra todos los individuos o animales de interés para el observador que se encuentren dentro de una distancia perpendicular prefijada a cada lado del transecto (el ancho de la banda). El presupuesto crítico de este método es que se detectan todos los individuos dentro de la banda. Dado que se cuentan todos los individuos, los transectos en

banda son tratados como cuadrantes (Burnham *et al*, 1981; Seber, 1982), en el caso de que se las use para determinar o estimar abundancia. En este caso se utilizó este método sólo para determinar presencia o ausencia en las zonas potenciales de registro de varias especies y tomar las muestras de Bd.

Este método, nos brinda información sobre la densidad, se requiere de una importante inversión de tiempo, el costo es bajo y la cantidad de personal es mediana.

Con frecuencia, los anfibios responden diferencialmente a los gradientes ambientales y en especial a aquellos que reflejan humedad. La metodología de transectos puede emplearse para muestrear tanto a lo largo de dichos gradientes ambientales o dentro de los tipos de hábitats. Se establecen Transectos de banda estrechas aleatoriamente, y dentro de estas porciones de hábitat se buscan anfibios minuciosamente (Jaeger, R.G. 1994).

El valor de la metodología de muestreo por transectos empleando diseños aleatorios, radica en que registra efectivamente número de especies, abundancias relativas y densidades a través de gradientes de hábitat; por lo que el método es muy útil, para determinar cambios intra e inter específicos en las poblaciones de anfibios a través de algún carácter ambiental que cambia continuamente. De este modo, el muestreo por transectos es la mejor técnica para estudiar gradientes altitudinales (o montañas) o gradientes de hábitats desde tierras bajas hacia tierras altas (Jaeger, R.G. 1994).

Debido a que los transectos están ubicados aleatoriamente, y dado que cada transecto constituye una muestra independiente, es posible realizar inferencias estadísticas a partir de datos así obtenidos, siempre que el número de transectos sea suficientemente grande. Las inferencias estadísticas pueden utilizarse tanto para monitorear cambios en un área dada a lo largo del tiempo o para evaluar diferencias faunísticas entre áreas en un tiempo dado (Jaeger, R.G. 1994).

Una vez recopilados los datos, es necesario clasificarlos para poder entender la situación de los mismos. Para esto, utilicé métodos de clasificación de estadística multivariante cuyo objetivo es construir modelos sobre la base de algunas variables independientes (Benfenati E. 2007).

De esta manera, el modelo puede reconocer la clase a la que corresponde cada uno de los datos u objetos a clasificar. (Benfenati E. 2007)

Los métodos estadísticos para la clasificación buscan la relación entre las variables independientes y la clase asignada. La condición para que se pueda aplicar el método de clasificación es que se defina de manera previa a la clase y que cada uno de los objetos del set de datos se asignado a una de las clases que se han definido. (Frank, I. *et al.* 2006)

Los criterios para definir las clases se definen, según Todeschini (2003):

1. Las clases se definen por vía teórica.
2. Las clases son definidas por una variable categórica
3. Las clases se buscan mediante el método de cluster análisis.
4. Las clases son definidas mediante la categorización de una variable cuantitativa.

Los métodos de clasificación vienen a ser más robustos que los métodos de regresión multivariante en los procesos de modelación, porque son menos sensibles a la incertidumbre de los errores a nivel experimental en la evaluación de la respuesta (Todeschini, R. 2003).

Los métodos de clasificación, se basan en la distancia mínima entre el objeto y el centroide más cercano de la clase en donde el nuevo objeto será incluido o clasificado (Todeschini, R. 2003).

La exploración de los datos fue hecha a través de “Clustering” dentro de los métodos de Análisis Multivariante, y tuvo como objetivo, la clasificación de individuos en grupos distintos, de manera que exista la mayor homogeneidad posible dentro de los grupos, con respecto a ciertas variables que pueden ser cuantitativas o cualitativas.

El Análisis Cluster, o Análisis de Conglomerados o Reconocimiento de Patrones, es una técnica estadística multivariante para dividir un conjunto de objetos en grupos de forma que los perfiles de los objetos en un mismo grupo sean muy similares entre sí (cohesión interna del grupo) y los de los objetos de clusters diferentes sean distintos (aislamiento externo del grupo) (Salvador-Figueras, M. 2001).

Este tipo de análisis se basa en el concepto de similitud, que matemáticamente hablando, corresponde al concepto de analogía, que se corresponde con la disimilitud. Estos conceptos se pueden poner en práctica y medirlos de manera cuantitativa a través del concepto de Distancia.

Mientras más distantes este un objeto del grupo de referencia en donde están otros objetos, más Disimilitud habrá y viceversa; mientras más cercanos estén del grupo de referencia, más vecinos o similares serán según sus características o variables a considerar (Todeschini, R. 2003).

Un prerequisite para el análisis de cluster es que las variables deben estar en una sola unidad de medida. Para esto se utilizó el *Range Scaling* (Figura2.) que transforma los valores de las variables entre valores mínimos y máximo de 0 y 1 respectivamente (Todeschini, R. 2003).

$$X'_{ij} = \frac{X_{ij} - L_j}{U_j - L_j}$$

Fig 2. Fórmula de *Range Scaling*

El método K-means que utilicé en este estudio, es un método cuyo algoritmo de recalcado de datos se basa en la relación de las distancias de cada objeto a clasificar con el centroide cada cluster (Todeschini, R. 2003).

El resultado que se obtiene a través del método K-means, depende de la clasificación inicial, la selección de la métrica con la cual se medirá la distancia entre el objeto y el centroide y el número de clusters que han sido seleccionados. Sin embargo, en la práctica, la importancia de la dependencia de la clasificación inicial es poco relevante (Todeschini, R. 2003).

De esta manera el análisis de las variables es posible, ya que la escala es compatible con la presencia y la ausencia de las 9 especies registradas en las 14 localidades y del quítrido, que son variables dicotómicas, junto a las variables geográficas y altitudinales que son continuas.

A este punto, una vez identificados los grupos, he procedido a verificar su coherencia mediante métodos de análisis de clasificación. Los métodos de clasificación construyen un modelo compuesto de variables descriptivas, en este caso, la altura, la ubicación geográfica, la presencia o ausencia de cada especie en una localidad de muestreo, la presencia o la ausencia del Bd y la pertenencia al menos a una clase -cluster- (Todeschini, R. 2003).

El método de clasificación KNN (K-th Nearest Neighbours) clasifica un objeto desconocido en función de la clase más numerosa entre los “k-vecinos”. Es un método robusto, es decir, que no presupone una distribución teórica que represente los datos, y tiene un proceso de autovalidación de un elemento a la vez, porque el objeto que se clasifica se extrae del espacio de los demás objetos (Todeschini, R. 2003). El único problema del KNN es que en el proceso del escalado se debe mantener la distancia relativa entre los objetos y el método de escala por rangos, respeta esta condición, por lo que se usó para este caso.

El parámetro de calidad en clasificación es el *No Error Rate* (NER) que representa la razón entre el número de casos correctamente clasificados dividido para el número de casos totales. Algunos softwares estadísticos utilizan el complemento 1, *Error Rate* (ER) el número de casos mal clasificados sobre el número de casos totales. Este parámetro, se define así:

$$\text{NER\%} = \frac{\sum g \text{ cgg}}{u} \times 100$$

Fig 3. Fórmula para cálculo de *No Error Rate* (Tasa de no error). En donde, cgg son los elementos que se encuentran en la línea diagonal de la matriz de confusión.

En el caso de KNN el NER y ER son cros validados “one leave out” (uno a uno), en cuanto a la asignación de clase, el objeto a clasificar es extraído del conjunto total de los datos, es decir no participa en la construcción del modelo.

Es importante anotar que la clasificación se realiza a partir de las variables observadas en los individuos.

## **Resultados**

Se registraron 147 individuos pertenecientes a 9 de las 12 especies reconocidas para el Parque (Coloma *et al.* 2011/2012); o 17 especies (Arbeláez, Vega. 2008), enfocándonos en las zonas de ecosistema páramo. Al mismo tiempo en la última campaña de muestreo (Junio/Diciembre 2012) se tomaron muestras SWAB para el análisis de quítrido (*Batrachochytrium dendrobatidis*) a través del método descrito por Boyle *et al* 2004.

Dentro del presente estudio, las muestras o registros de anfibios contienen variables geográficas, altitudinales, de especie y de presencia y ausencia del hongo Bd, las cuales se pretenden correlacionar para determinar un posible factor de distribución para el hongo dependiendo de las condiciones que presente cada muestra o grupo.

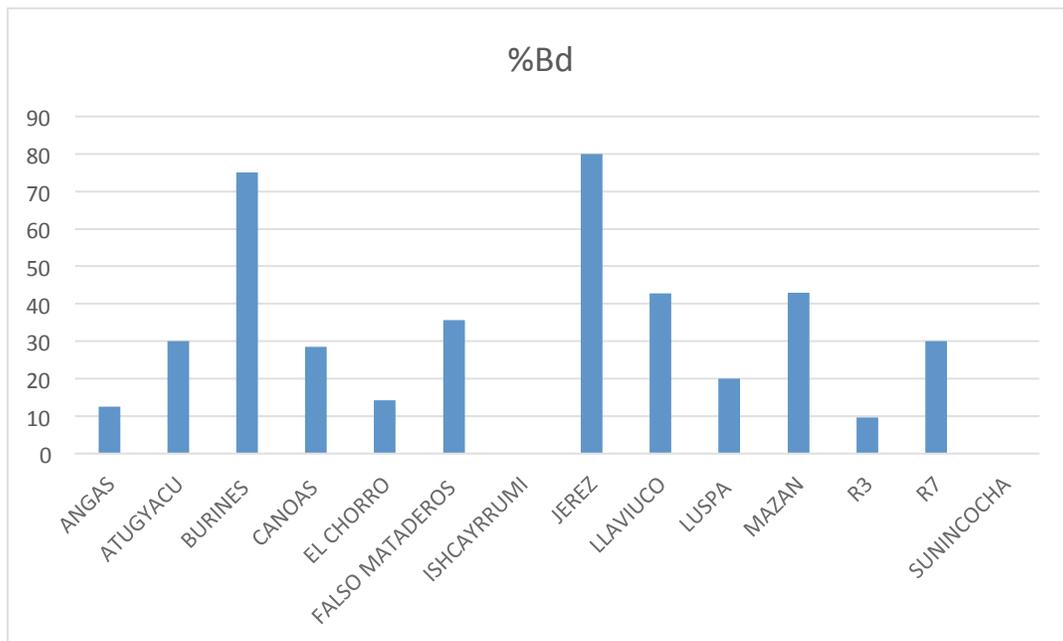
### **Análisis descriptivo de los Datos**

De los registros obtenidos y sus características, se ha analizado las especies con mayor sensibilidad (en número de observaciones) y las localidades en donde mayor incidencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* existe.

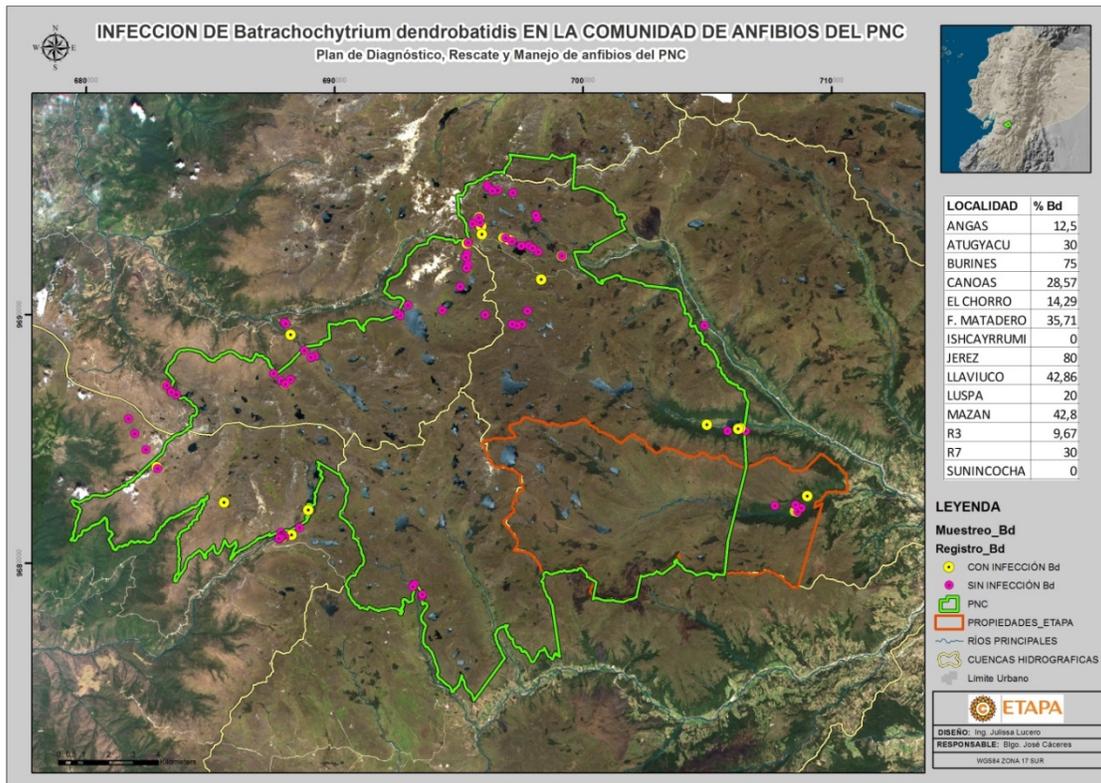
En general, el porcentaje de ocurrencia del Bd en todos los registros de este estudio en el PNC es de alrededor del 35%, pero existen localidades en donde la presencia del quítrido es de 0% (Ishcayrumi), mientras que en otras, la presencia es alta como el caso de Jerez (80%). (Tabla 2.) (Figuras 4 y 5.)

**Tabla 2.** Porcentaje de Infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* por Localidad.

LOCALIDAD	% Bd
ANGAS	12,5
ATUGYACU	30
BURINES	75
CANOAS	28,57
EL CHORRO	14,29
F. MATADERO	35,71
ISHCAYRRUMI	0
JEREZ	80
LLAVIUCO	42,86
LUSPA	20
MAZAN	42,8
R3	9,67
R7	30
SUNINCOCHA	0



**Fig 4.** Porcentaje de anfibios con *Batrachochytrium dendrobatidis* positivo por localidad

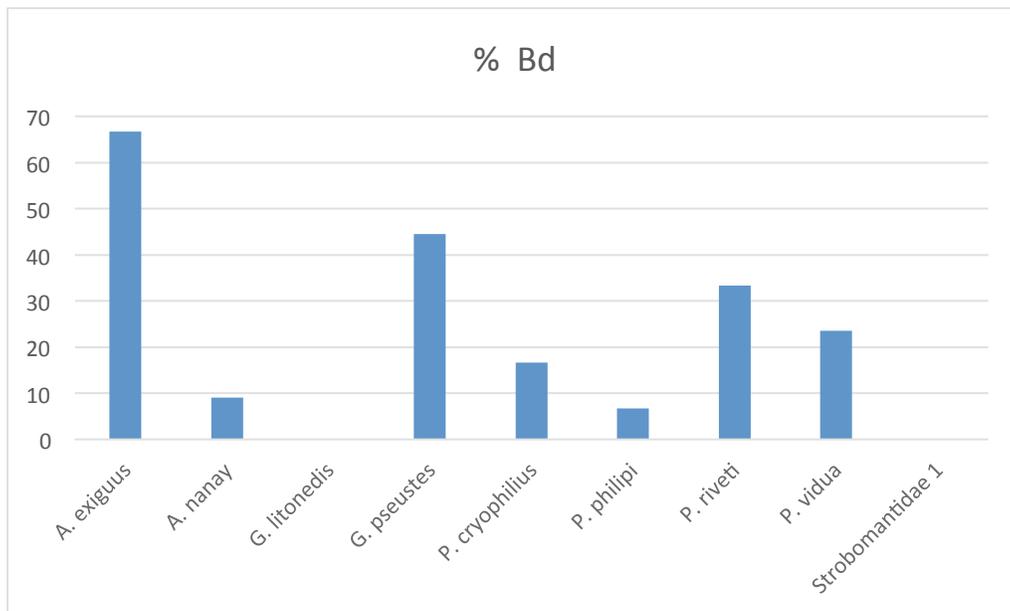


**Fig 5.** Infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios del PNC por localidad

En el caso de las especies, los registros varían, y esto podría reflejar el grado de sensibilidad de cada una de ellas al *Batrachochytrium dendrobatidis* y las preferencias de hábitat y condiciones ecológicas relacionadas con sus particulares historias naturales. Es así, que el mayor porcentaje de Bd positivo se encuentra en *Atelopus exiguus* (66.6%) y en *Gastrotheca pseustes* (44.44%), especies en dependencia directa con cuerpos de agua. (Tabla 3.) (Figuras 5 y 7.)

**Tabla 3.** Porcentaje de Infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* por especie.

ESPECIE	% Bd
<i>A. exiguus</i>	66,66
<i>A. nanay</i>	9,09
<i>G. litonedis</i>	0
<i>G. pseustes</i>	44,44
<i>P. cryophilus</i>	16,66
<i>P. philipi</i>	6,66
<i>P. riveti</i>	33,33
<i>P. vidua</i>	23,53
Strobomantidae 1	0



**Fig 6.** Porcentaje de anfibios con *Batrachochytrium dendrobatidis* positivo por especie

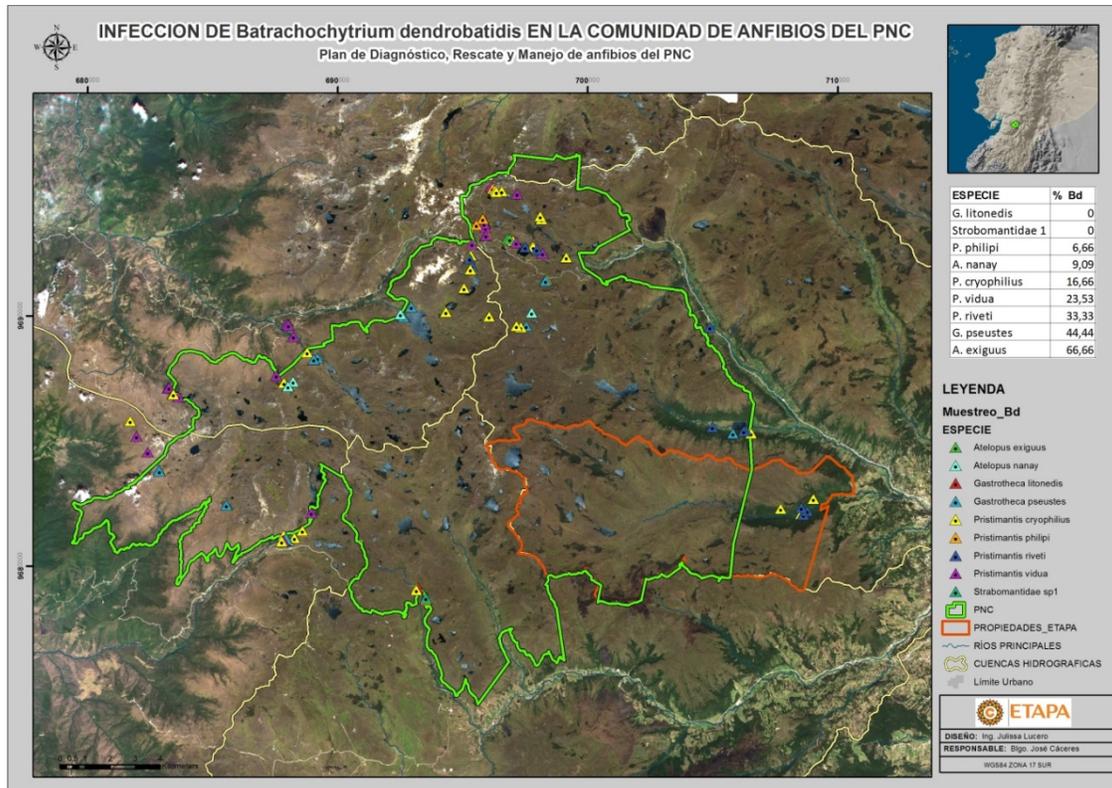


Fig 3. Infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios del PNC por especie

### Análisis Multivariante de los Datos

Para la construcción del cluster, se utilizó la distancia de Canberra (Frank, I. *et al.* 2006. Todeschini, R. 2003) y el método del promedio en cuanto a aglomeración.

Este análisis permitió reconocer 5 grupos con comportamientos parecidos que tenían similitudes, pero en el resultado general, no se puede reportar un factor o una suma de factores que desencadenen un patrón de infección.

Los algoritmos jerárquicos presentan los resultados como dendrogramas, como se presenta en el siguiente gráfico:

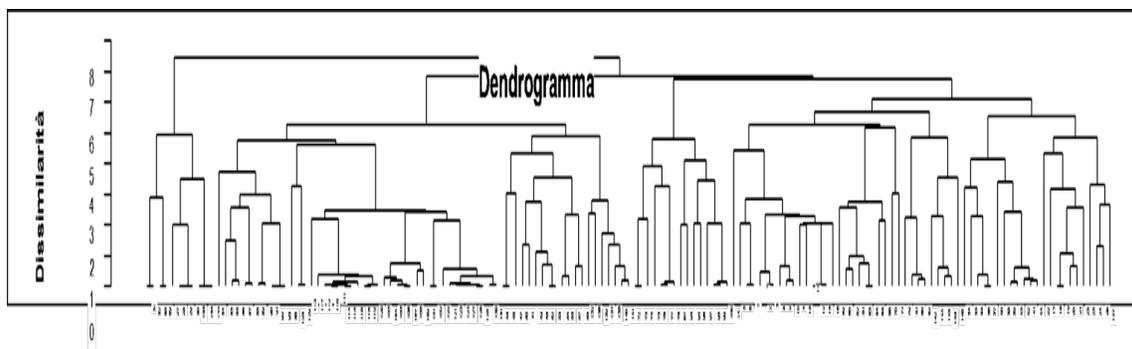


Fig 7. Dendrograma para identificación de grupos por el método *k-means*

### Descripción de los Grupos o clases Identificadas

**Grupo 1:** Bajo valor de infección de Bd, igual que grupo 5, mayor presencia de las especies 5 y 8 (*P. cryophilus* y *P. vidua*) y localidad 12 (R3). Presenta el rango más alto de altitud y la infección de Bd es baja en todas las especies. (Tabla 4.)

Tabla 4. Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 1

COD	ESPECIE	LOCALIDAD	bd	Clase	coor1se	coor2se	altsinescalar
PNC 064	<i>Atelopus exiguus</i>	Falso Mataderos	1	1	696802	9693086	3995
PNC 065	<i>Atelopus exiguus</i>	Falso Mataderos	1	1	696888	9693069	3994
PNC 125	<i>Atelopus exiguus</i>	Falso Mataderos	0	1	696891	9693065	3823
PNC 024	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Falso Mataderos	0	1	697791	9692762	3774
PNC 026	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Falso Mataderos	0	1	697821	9692751	3915
PNC 066	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Falso Mataderos	1	1	697009	9693012	3964
PNC 194	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Falso Mataderos	1	1	699150	9692352	3814
PNC 195	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Falso Mataderos	0	1	699150	9692352	3814
PNC 196	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Falso Mataderos	0	1	699150	9692352	3814
PNC 126	<i>Pristimantis riveti</i>	Falso Mataderos	0	1	697504	9692753	3932
PNC 127	<i>Pristimantis riveti</i>	Falso Mataderos	0	1	697970	9692667	3894
PNC 023	<i>Pristimantis</i>	Falso Mataderos	1	1	697081	9692995	3734

	<i>vidua</i>						
PNC 028	<i>Pristimantis vidua</i>	Falso Mataderos	0	1	698190	9692516	3875
PNC 193	<i>Pristimantis vidua</i>	Falso Mataderos	0	1	697138	9692926	3940
PNC 112	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Luspa	0	1	692644	9689978	3796
PNC 242	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Luspa	0	1	692947	9690359	3774
PNC 246	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Luspa	0	1	692649	9689963	3774
PNC 032	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Luspa	0	1	695052	9691113	3964
PNC 073	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Luspa	1	1	695318	9692855	4054
PNC 169	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Luspa	0	1	695328	9692426	4060
PNC 206	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Luspa	0	1	695310	9691860	4016
PNC 204	<i>Pristimantis riveti</i>	Luspa	0	1	695289	9692290	4052
PNC 205	<i>Pristimantis riveti</i>	Luspa	0	1	695376	9691990	4047
PNC 030	<i>Pristimantis vidua</i>	Luspa	1	1	695376	9692873	4150
PNC 072	<i>Pristimantis vidua</i>	Luspa	1	1	695367	9692855	4112
PNC 165	<i>Pristimantis vidua</i>	Luspa	0	1	695380	9692876	4152
PNC 166	<i>Pristimantis vidua</i>	Luspa	0	1	695380	9692876	4152
PNC 167	<i>Pristimantis vidua</i>	Luspa	0	1	695380	9692876	4152
PNC 089	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Ruta 3	0	1	695817	9693909	4100
PNC 107	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Ruta 3	0	1	695844	9693834	4098
PNC 085	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 3	0	1	695839	9693664	4090
PNC 190	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 3	0	1	696567	9694984	4055
PNC 228	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 3	0	1	696319	9695027	4132
PNC 231	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 3	0	1	696352	9694963	4106
PNC 233	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 3	0	1	696352	9694963	4106

PNC 239	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 3	0	1	698155	9693869	4010
PNC 240	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 3	0	1	698108	9693983	3894
PNC 039	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	695931	9693215	4070
PNC 041	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	695931	9693235	4073
PNC 104	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	695954	9693271	4100
PNC 110	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	1	1	695817	9693909	4107
PNC 146	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	695916	9693207	4082
PNC 148	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	695915	9693215	4086
PNC 157	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	695812	9693882	4112
PNC 163	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	695548	9693645	4239
PNC 186	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	696297	9695043	4141
PNC 187	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	696297	9695043	4141
PNC 227	<i>Pristimantis philipi</i>	Ruta 3	0	1	696207	9695086	4163
PNC 038	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	695915	9693208	4111
PNC 043	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	697183	9694891	4009
PNC 086	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	695871	9693722	4083
PNC 088	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	695829	9693857	4094
PNC 105	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	1	1	695912	9693538	4098
PNC 109	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	695829	9693857	4114
PNC 153	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	695856	9693689	4096
PNC 156	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	695812	9693882	4121
PNC 182	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	1	1	695935	9693225	4091
PNC 183	<i>Pristimantis vidua</i>	Ruta 3	0	1	696189	9695091	4173
PNC 226	<i>Pristimantis</i>	Ruta 3	0	1	696155	9695181	4192

	<i>vidua</i>						
PNC 081	<i>Atelopus nanay</i>	Ruta 7	0	1	697768	9690135	3950
PNC 018	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 7	0	1	694330	9690165	3870
PNC 044	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 7	0	1	696067	9689983	3984
PNC 159	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 7	0	1	698345	9691448	3782
PNC 160	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 7	0	1	697336	9689550	3908
PNC 161	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ruta 7	0	1	697154	9689596	3933

Total	65
Enfermos	11
PromAltura	4016
% de Infeccion	17

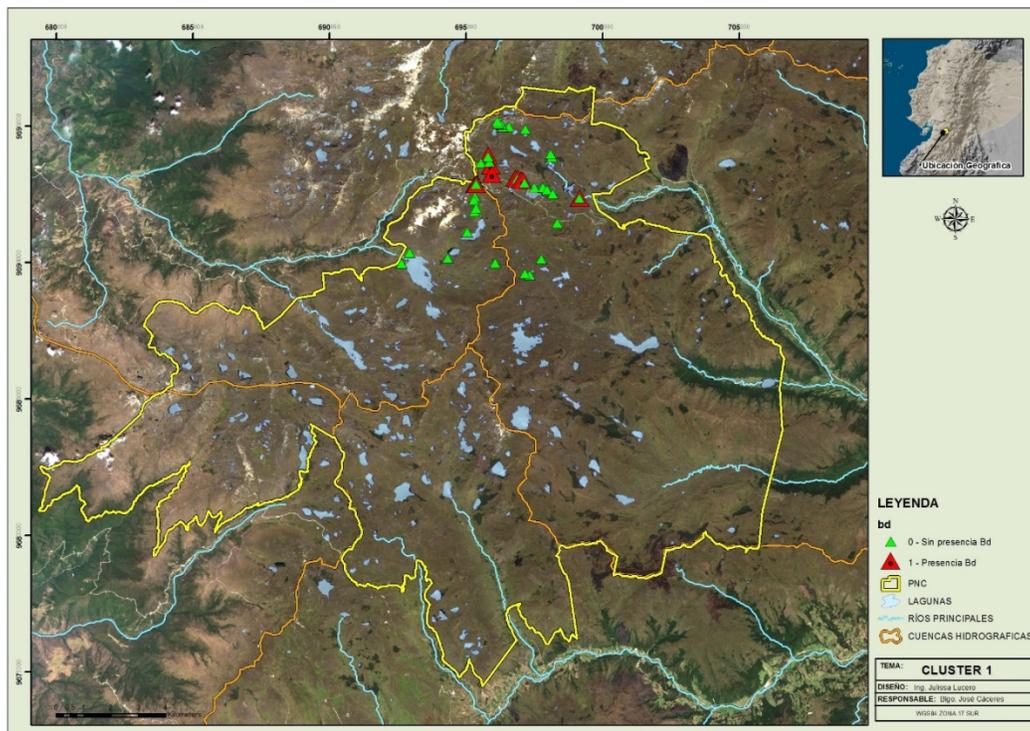


Fig 8. Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 1 -presencia y ausencia de Bd-

**Grupo 2:** presenta el índice más bajo de infección de Bd. Las especies más abundantes son la 5 y 8 (*P. cryophilus* y *P. vidua*) en la localidad 1 (Angas), rango altitudinal elevado y coincide con grupos 3 y 5. (Tabla 5.)

**Tabla 5.** Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 2

<b>COD</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>LOCALIDAD</b>	<b>bd</b>	<b>Clase</b>	<b>coor1</b>	<b>coor2</b>	<b>altsinescalar</b>
PNC 020	<i>Atelopus nanay</i>	Angas	0	2	688013	9681044	3815
PNC 021	<i>Atelopus nanay</i>	Angas	0	2	687950	9681115	3783
PNC 176	<i>Atelopus nanay</i>	Angas	0	2	687899	9681062	3785
PNC 141	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Angas	0	2	687836	9681016	3772
PNC 136	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Angas	0	2	687960	9681106	3778
PNC 179	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Angas	0	2	687855	9681020	3775
PNC 174	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Angas	0	2	688596	9681418	3637
PNC 177	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Angas	0	2	687852	9681031	3786
PNC 181	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Angas	0	2	687766	9680987	3764
PNC 139	<i>Pristimantis philipi</i>	Angas	0	2	687849	9681023	3764
PNC 140	<i>Pristimantis philipi</i>	Angas	0	2	687849	9681023	3764
PNC 143	<i>Pristimantis philipi</i>	Angas	0	2	687812	9681002	3770
PNC 019	<i>Pristimantis vidua</i>	Angas	1	2	688943	9682130	3807
PNC 180	<i>Pristimantis vidua</i>	Angas	0	2	687829	9681013	3772
PNC 144	Strabomantidae sp1	Angas	0	2	687757	9680969	3763
PNC 094	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Atugyacu	1	2	688006	9687206	3891
PNC 128	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Atugyacu	0	2	687860	9687328	3635
PNC 093	<i>Pristimantis vidua</i>	Atugyacu	0	2	687554	9687621	3641
PNC 098	<i>Pristimantis vidua</i>	Atugyacu	1	2	688236	9689179	3656
PNC 197	<i>Pristimantis vidua</i>	Atugyacu	0	2	687976	9689678	3497
PNC 134	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Canoas	0	2	682878	9683803	3927
PNC 131	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Canoas	0	2	681706	9685809	3685
PNC 016	<i>Pristimantis vidua</i>	Canoas	0	2	682403	9684559	3978
PNC 132	<i>Pristimantis vidua</i>	Canoas	0	2	681961	9685190	3921
PNC 133	<i>Pristimantis vidua</i>	Canoas	0	2	681961	9685190	3921
PNC 172	<i>Pristimantis cryophilus</i>	El Chorro	0	2	683439	9686875	4016

PNC 036	<i>Pristimantis vidua</i>	El Chorro	0	2	683639	9686768	3978
PNC 102	<i>Pristimantis vidua</i>	El Chorro	1	2	683236	9687119	3769
PNC 121	<i>Pristimantis vidua</i>	El Chorro	0	2	683223	9687110	3877
PNC 123	<i>Pristimantis vidua</i>	El Chorro	0	2	683251	9687141	3900
PNC 170	<i>Pristimantis vidua</i>	El Chorro	0	2	683426	9686896	4000
PNC 171	<i>Pristimantis vidua</i>	El Chorro	0	2	683436	9686877	3884
PNC 201	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Ischcayrrumi	0	2	693215	9679140	3807
PNC 054	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ischcayrrumi	0	2	693538	9678680	3675
PNC 059	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ischcayrrumi	0	2	693537	9678697	3823
PNC 200	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ischcayrrumi	0	2	693164	9679130	3615
PNC 202	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ischcayrrumi	0	2	693150	9679044	3809
PNC 203	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Ischcayrrumi	0	2	693151	9679041	3809
PNC 057	<i>Pristimantis philipi</i>	Ischcayrrumi	0	2	693525	9678656	3824
PNC 062	Strabomantidae sp1	Ischcayrrumi	0	2	693539	9678730	3821
PNC 010	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Jerez	1	2	688274	9681130	3958
PNC 011	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Jerez	0	2	687838	9681237	3813

Total	41
Enfermos	5
PromAltura	3802
% de Infeccion	12,2

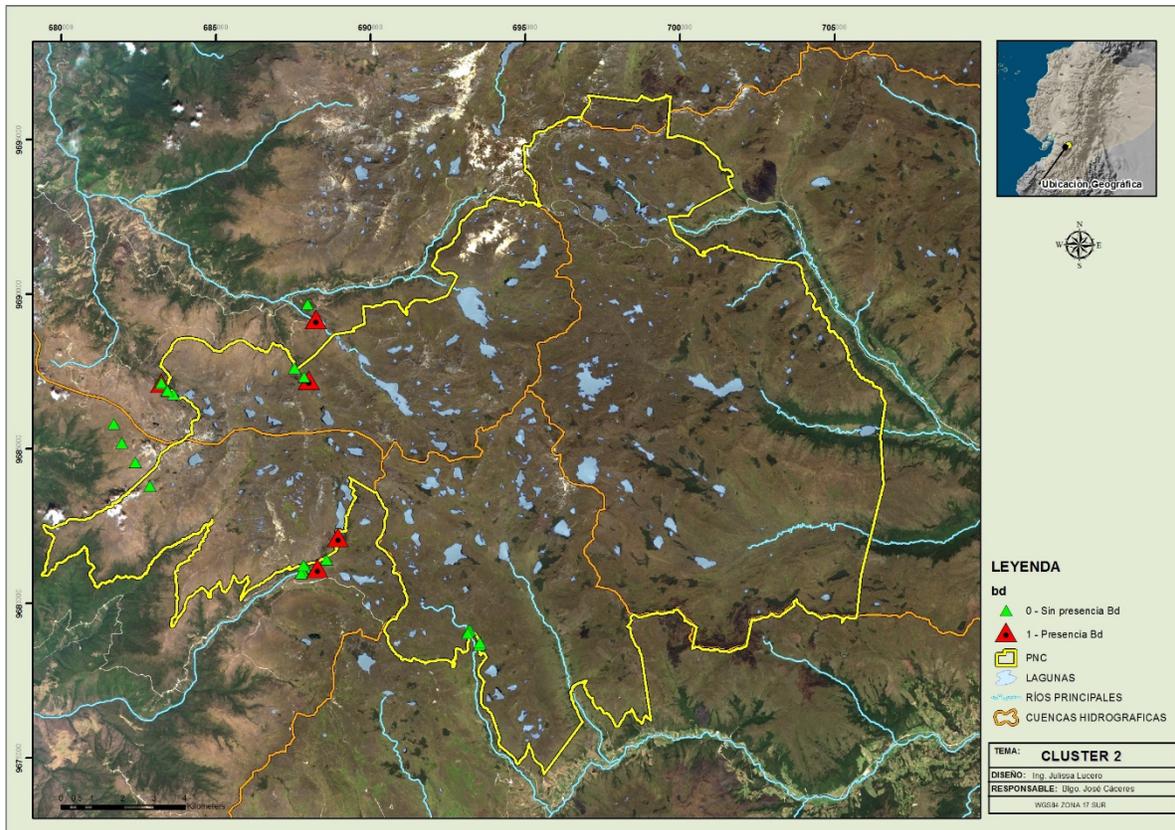


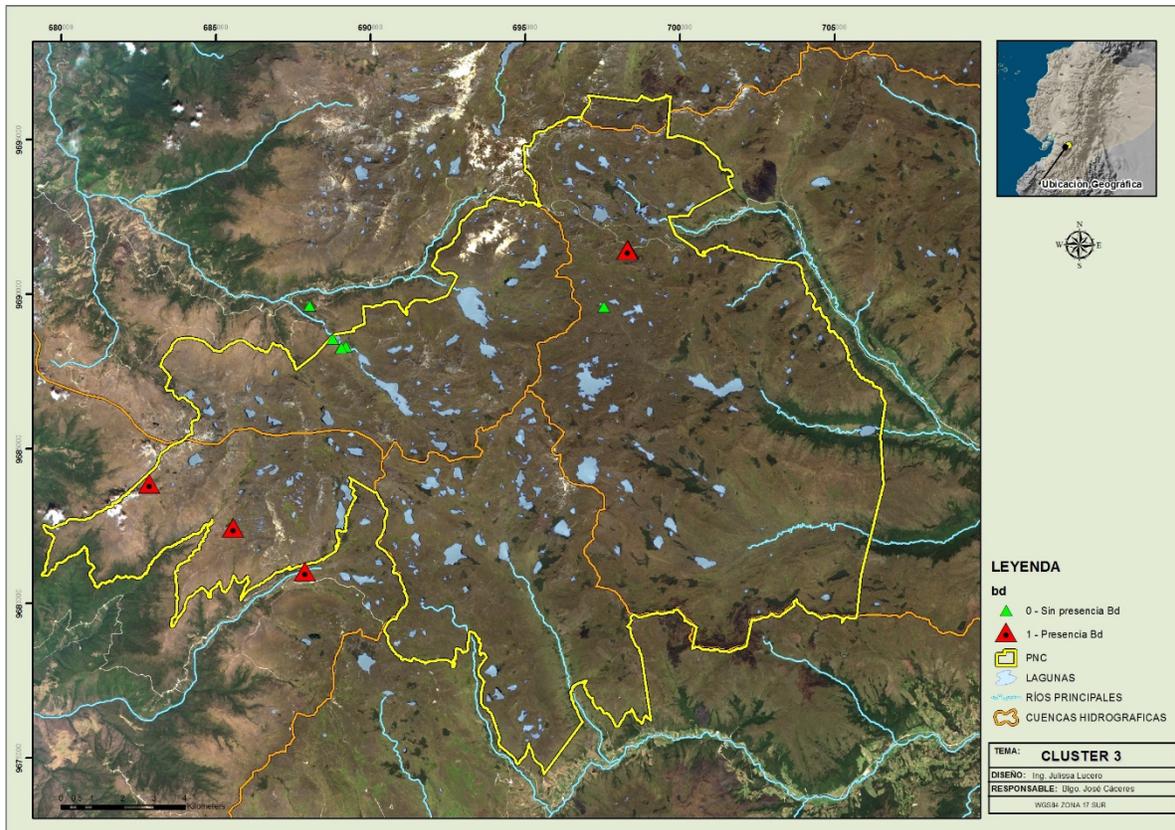
Fig 9. Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 2 -presencia y ausencia de Bd-

**Grupo 3:** mayor incidencia de Bd, gran presencia sp4 (*G. pseustes*), en especial en localidades 3, 13 y 14 (Burines, R7 y Sunincocha); alta infección en sp4 (*G. pseustes*); rango altitudinal elevado y coincide con grupo 2 y 5. (Tabla 6.)

**Tabla 6.** Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 3

<b>COD</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>LOCALIDAD</b>	<b>bd</b>	<b>Classe</b>	<b>coor1</b>	<b>coor2</b>	<b>altsinescalar</b>
PNC 022	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Angas	1	3	687874	9681025	3779,0
PNC 252	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Burines	0	3	698320	9691410	3993,0
PNC 254	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Burines	1	3	698320	9691410	3993,0
PNC 256	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Burines	1	3	698320	9691410	3993,0
PNC 257	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Burines	1	3	698320	9691410	3993,0
PNC 012	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Canoas	1	3	682851	9683857	3867,0
PNC 015	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Canoas	1	3	682851	9683860	3867,0
PNC 007	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Jerez	1	3	685559	9682436	3958,0
PNC 008	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Jerez	1	3	685559	9682437	3958,0
PNC 009	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Jerez	1	3	685559	9682438	3958,0
PNC 075	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Ruta 7	1	3	698295	9691416	3767,0
PNC 077	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Ruta 7	1	3	698295	9691418	3767
PNC 079	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Ruta 7	1	3	698295	9691420	3767
PNC 082	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Ruta 7	0	3	697546	9689596	3916
PNC 249	<i>Atelopus nanay</i>	Sunincocha	0	3	689047	9688270	3764
PNC 099	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Sunincocha	0	3	689058	9688261	3694
PNC 100	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Sunincocha	0	3	689200	9688313	3770
PNC 250	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Sunincocha	0	3	689054	9688262	3765
PNC 224	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Sunincocha	0	3	688784	9688553	3577
PNC 225	<i>Pristimantis vidua</i>	Sunincocha	0	3	688039	9689623	3635

Total	19
Enfermos	12
PromAltura	3839
% de Infeccion	63,2



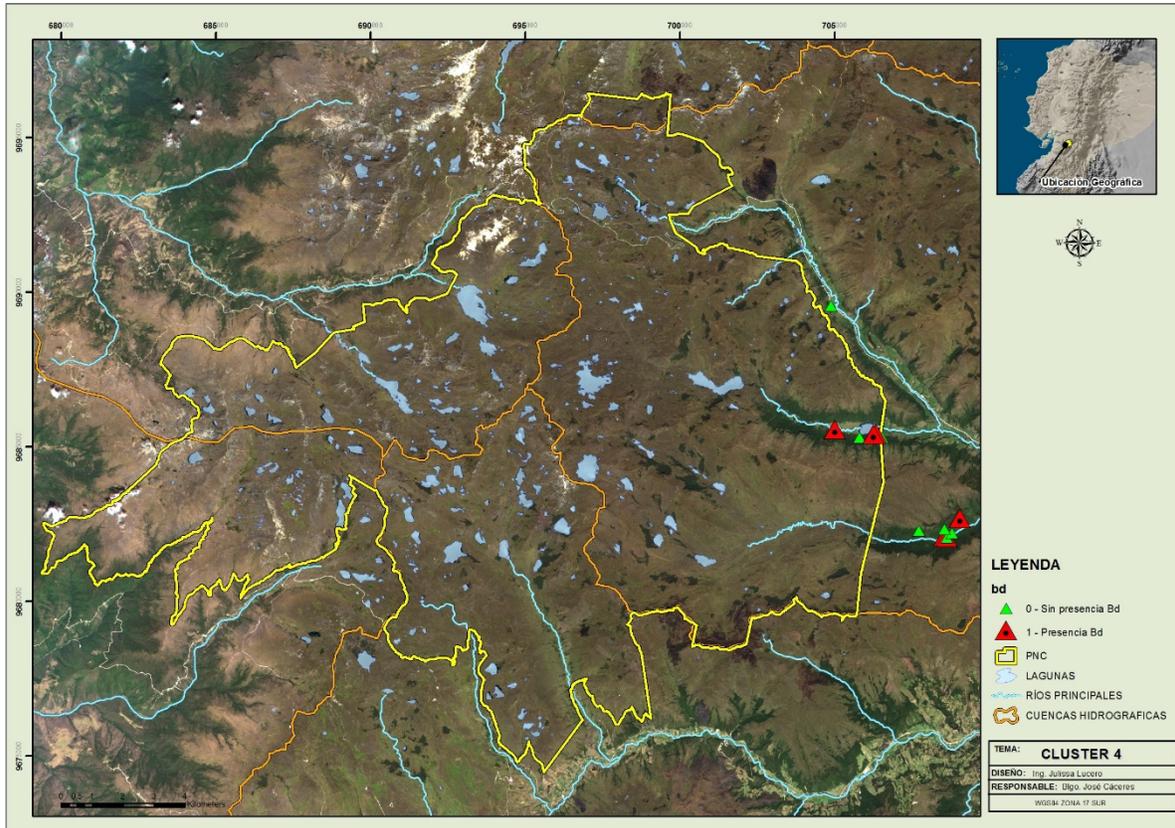
**Fig 10.** Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 3 -presencia y ausencia de Bd-

**Grupo 4:** presenta el segundo mayor valor de infección de Bd, en especial en la sp7 (*P. riveti*). Las especies más abundantes en el grupo son sp7 (*P. riveti*) y sp 5 (*P. cryophilus*), en las localidades 9 y 11 (Llaviucu y Mazán). El rango altitudinal es el más bajo de todos los grupos. (Tabla 7.)

**Tabla 7.** Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 4

<b>COD</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>LOCALIDAD</b>	<b>bd</b>	<b>Clase</b>	<b>coor1</b>	<b>coor2</b>	<b>altsinescalar</b>
PNC 001	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Llaviuco	0	4	705818	9685313	2968
PNC 003	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Llaviuco	0	4	705818	9685313	2968
PNC 101	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Llaviuco	0	4	706538	9685308	3204
PNC 006	<i>Pristimantis riveti</i>	Llaviuco	0	4	704893	9689557	3380
PNC 209	<i>Pristimantis riveti</i>	Llaviuco	1	4	706334	9685423	3155
PNC 217	<i>Pristimantis riveti</i>	Llaviuco	1	4	706252	9685398	3176
PNC 261	<i>Pristimantis riveti</i>	Llaviuco	1	4	704992	9685559	3094
PNC 045	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Mazán	1	4	708530	9682082	2923
PNC 063	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Mazán	1	4	709037	9682688	2901
PNC 111	<i>Pristimantis cryophilus</i>	Mazán	0	4	707724	9682293	2939
PNC 046	<i>Pristimantis riveti</i>	Mazán	1	4	708613	9682064	3142
PNC 048	<i>Pristimantis riveti</i>	Mazán	0	4	708639	9682060	3138
PNC 052	<i>Pristimantis riveti</i>	Mazán	0	4	708793	9682211	3122
PNC 207	<i>Pristimantis riveti</i>	Mazán	0	4	708554	9682338	3280

Total	13
Enfermos	6
PromAltura	3099
% de Infeccion	46,2



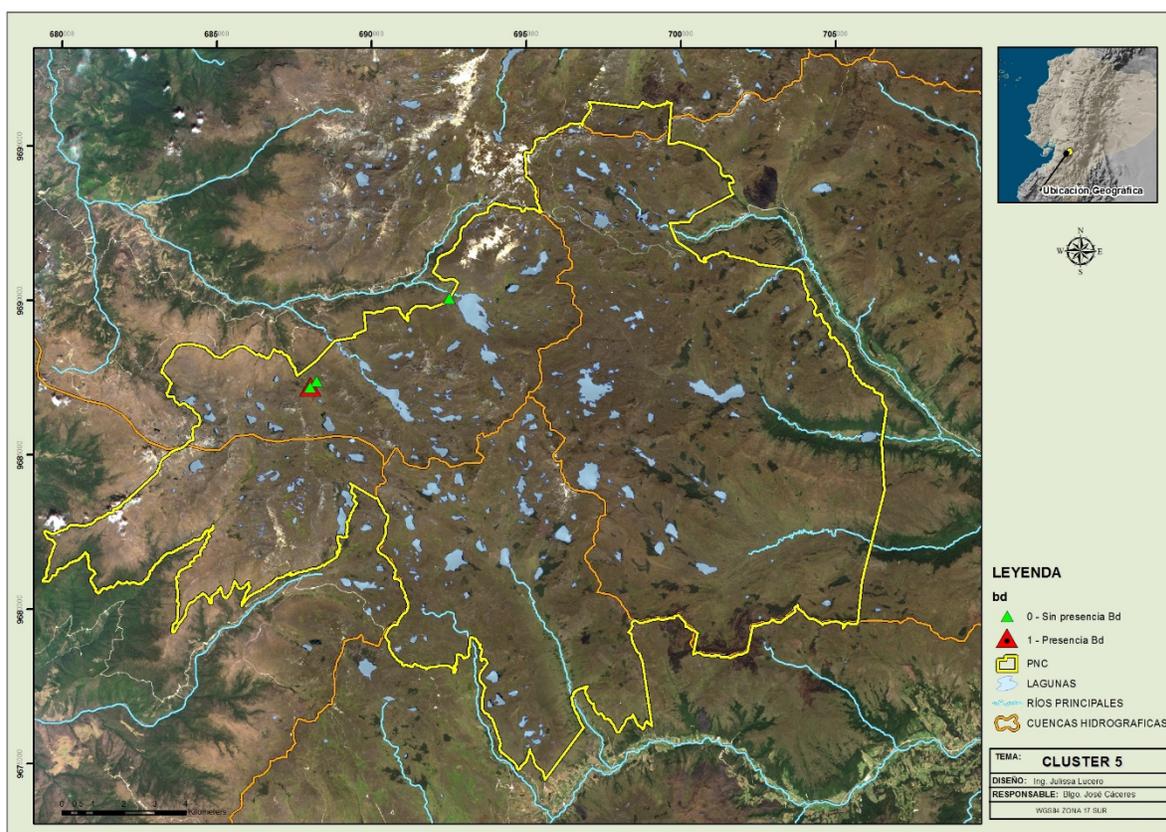
**Fig 11.** Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 4 -presencia y ausencia de Bd-

**Grupo 5:** baja cantidad de infección de Bd, igual que grupo 1. Presencia elevada de sp 2 (*A. nanay*) y localidad 2 (Atugyacu). La infección por especies en general es reducida y el rango altitudinal es medio-alto, compartiendo el mismo con los grupos 3 y 5. (Tabla 8.)

**Tabla 8.** Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 5

COD	ESPECIE	LOCALIDAD	Bd	Clase	coor1	coor2	Altsinescalar
PNC 095	<i>Atelopus nanay</i>	Atugyacu	1	5	688025	9687195	3893
PNC 129	<i>Atelopus nanay</i>	Atugyacu	0	5	688025	9687195	3635
PNC 130	<i>Atelopus nanay</i>	Atugyacu	0	5	688007	9687201	3635
PNC 198	<i>Atelopus nanay</i>	Atugyacu	0	5	688228	9687381	4055
PNC 199	<i>Atelopus nanay</i>	Atugyacu	0	5	688023	9687194	3901
PNC 248	<i>Atelopus nanay</i>	Luspa	0	5	692522	9690067	3774

Total	6
Enfermos	1
PromAltura	3816
% de Infeccion	16,7



**Fig 12.** Registros clasificados dentro del grupo (cluster) 5-presencia y ausencia de Bd-

## Discusión y Conclusiones

### Validación del cluster, KNN

A través del análisis estadístico multivariado, con el método KNN, en base a las similitudes en las variables de cada una de las muestras, se validaron los 5 grupos identificados inicialmente. Esta validación es posible, ya que los valores para escoger el número de “K” vecinos es el menor (0.0476), por lo tanto sugiere tomar 3 o 4. Se decide tomar 3 “K” vecinos ya que así es mejor la aproximación del espacio entre clases.

Cross-validated Error Rate: 0.0476

Cross-validated Risk: 0.0476

**Tabla 9.** Porcentaje de error de clasificación (*Error Rate*) método KNN

K	ER Cv
1	0,0554
2	0,0952
3	0,0476
4	0,0476
5	0,068

Se valida el análisis de los clusters obtenidos mediante K-means utilizando el método KNN, comprobando el NER (No Error Rate) a través de los datos generados en la matriz de confusión, en donde se resume numéricamente la frecuencia de objetos correcta e incorrectamente clasificados.

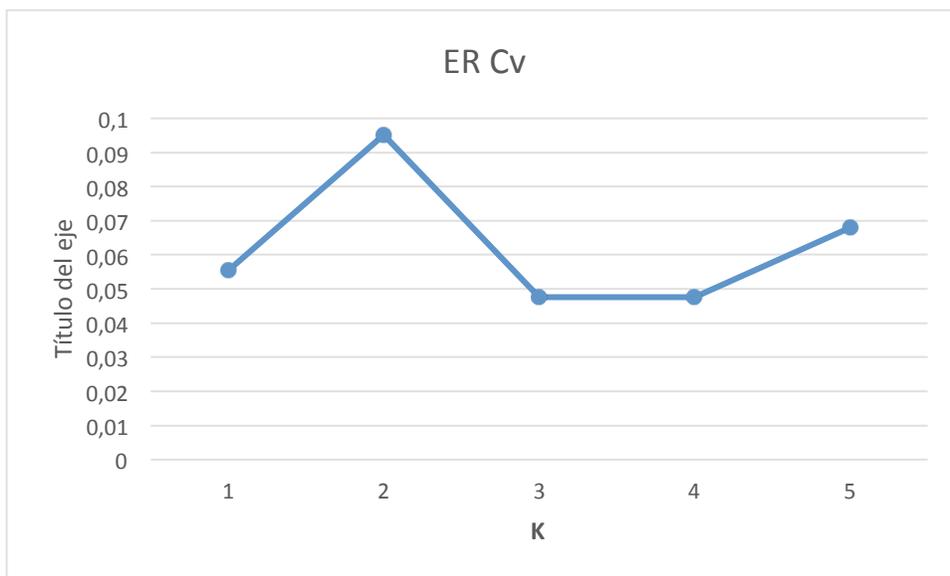


Fig 13. Validación del *Error Rate*.

Tabla 10. Matriz de confusión para validación de *k-means* a través del método KNN.

MATRIZ DE CONFUSIÓN						
Clase KMEANS	Clase Asignada KNN					
	No	1	2	3	4	5
1	65	65	0	0	0	0
2	42	0	40	1	0	1
3	20	1	2	17	0	0
4	14	0	1	0	13	0
5	6	1	0	0	0	5

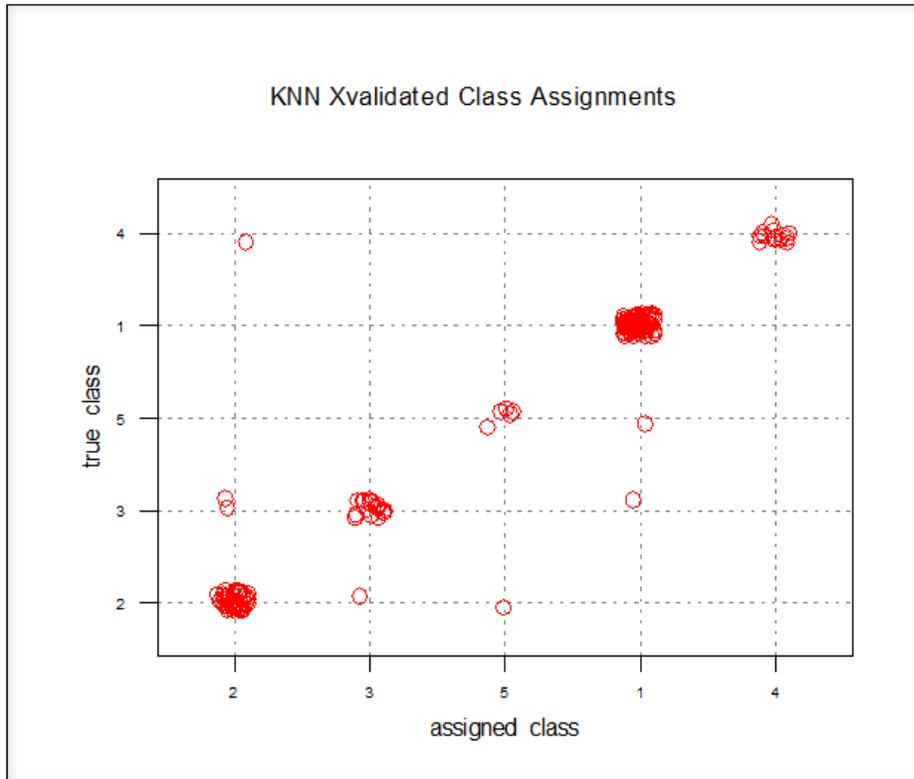


Fig 14. Clasificación gráfica y validación de las clases asignadas -método KNN-

Estos grupos han sido analizados de acuerdo a sus variables para bosquejar un probable modelo de distribución y los probables factores que determinan o favorecen la aparición del hongo Bd en los anfibios de acuerdo a las variables geográficas y altitudinales que se presentan dentro del PNC.

La altura, aparentemente y de manera preliminar no es un factor determinante en la aparición del hongo Bd en los anfibios en el Parque Nacional Cajas, ya que los niveles de altura no interfieren con los de temperatura que sí podrían condicionar el desarrollo y la acción patógena del mismo. En los diferentes grupos encontrados (clusters), la variación altitudinal, en promedio es amplia, pero aun así, los patrones de temperatura registrados a esas altitudes no difieren tanto, inclusive en los diferentes regímenes estacionales.

Según los datos oficiales del PNC (2008), el rango de temperatura dentro del parque va desde los -2°C hasta los 18°C, lo cual, se ve condicionado por la estación, la presencia de viento, sol, lluvia

etc., pero de todas maneras se mantiene dentro de las temperaturas aptas para la supervivencia y desarrollo del *Batrachochytrium dendrobatidis*.

En 3 de los 5 grupos, la mayor representatividad de especies son las del género *Pristimantis*, por su abundancia relativa en relación con las otras. Además, el hábitat del género, por su singular característica de desarrollo ovovivíparo, no necesariamente tiene una relación con un cuerpo de agua en donde el contagio podría ser mayor o más intenso, y de esta manera este grupo de especies aparentemente ha logrado sobrevivir o convivir con el Bd, o la tasa de mortalidad es menor.

Los registros de *Atelopus* son escasos y la tasa de infección con Bd es baja también, probablemente porque la mayoría de los casos los animales no lograron sobrevivir a la enfermedad, ya que la probabilidad e intensidad de infección es elevada al vivir en contacto permanente con las zoosporas en su estado más fuerte para insertarse en su hospedero.

Las especies mayormente enfermas en porcentaje son *Atelopus exiguus*, *Gastrotheca pseustes* y *Pristimantis riveti*, lo cual nos muestra un patrón de preferencia de hábitat, y por lo tanto condiciones de vida del Bd, y una diferencia en el grado de susceptibilidad a la enfermedad. Particularmente en *A. exiguus* y en *G. pseustes*, en las cuales la cantidad de registro es escaso.

El registro más alto es de un *Pristimantis vidua* en la Localidad de Luspa, a 4150msnm, lo cual corrobora la estabilidad y el patrón que sigue las características para la clasificación del grupo 1, en donde el mayor número de animales con Bd corresponden a esa misma especie y a una altitud elevada, sin embargo el índice de presencia de esta misma especie es alto, por lo cual parecería posible algún tipo de condición que los haría resistentes a la enfermedad.

En general, la mayor cantidad de registros de anfibios infectados con Bd en el PNC, corresponden a las especies pertenecientes al género *Pristimantis*. Probablemente, esto refleje también la facilidad de registro de estas especies en comparación a las demás por su abundancia

El grupo que más infección presenta es el número 3, con una elevada presencia de la especie *Gastrotheca pseustes*, de la que no se han registrado gran cantidad de ejemplares en comparación a las especies del género *Pristimantis*, pero con un gran índice de susceptibilidad el hongo. Al igual que en otras especies, como las el género *Atelopus*, los registros son escasos, pero el índice de infección es alto. Probablemente, tiene que ver con las características ecológicas de la especie que

habita en zonas de elevada humedad, y utiliza principalmente charcas con aguas estancadas para su reproducción, en donde las condiciones, especialmente, de temperatura puede ser las más óptimas para la supervivencia y desarrollo del Bd.

Esto indica que la distribución de las especies de anfibios se podría en el futuro limitar a zonas con rangos altitudinales, de temperatura y condiciones ecológicas acordes a las óptimas para Bd, que coinciden en muchos casos con las especies de los géneros *Atelopus* y *Gastrotheca* presentes en el PNC.

### **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Piercosimo Tripaldi, director de esta investigación, al Blgo. Juan Webster, por su valiosa asistencia en el trabajo de campo, A ETAPA EP y al Dr. Alfredo Martínez Subgerente del PNC, al personal técnico y de Guardaparques del PNC y la Subgerencia de Gestión Ambiental de ETAPA-EP, a mi familia por el apoyo e inspiración.

### **Referencias Bibliográficas**

Acosta-Galvis, A. *et al.* 2006. Descubrimiento de una nueva especie de *Atelopus* (bufonidae) para Colombia: ¿una luz de esperanza o el ocaso de los sapos arlequines? Revista Académica Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Alford y Richards *et al.*, 1999. Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. School of Tropical Biology and cooperative Research Centre for tropical Rainforest Ecology and Management, James Cook University Annual reviews. Queensland, Australia.

Angulo, A., J. Rueda-Almonacid, J. Rodríguez-Macheca, y E. La Marca (Eds.). 2006. Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina. Serie de Manuales para la Conservación N°2. Conservación Internacional. Panamericana Formas e Impresos S.A., BogotáD.C. 298pp.

Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, Daszak P, Longcore JE. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. Journal of Wildlife Diseases, 40, 420–428.

Arbeláez E., Vega A., 2008. Guía de Anfibios, Reptiles y Peces del Parque Nacional Cajas. Corporación Municipal Parque Nacional Cajas, ETAPA, Cuenca, Ecuador.

Benfenati, E. 2007. Quantitative Structure-Activity relationships (QSAR) for pesticide Regulatory purposes Laboratory of Environmental Chemistry and Toxicology, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri". Elsevier

Berger, L R., AD Hyatt, Speare, and JE. Longcore. 2005. Life cycles stages on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Disease of Aquatic Organisms* 68: 51-63

Blaustein AR., and PTJ Johnson. 2010. When an infection turns lethal. *Conservation Biology* 465: 881-882.

Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., and Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141-148.  
[http://amphibiaweb.org/chytrid/swab\\_instruction\\_Spanish\\_2009.pdf](http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_instruction_Spanish_2009.pdf)

Bradley, G., P. Rosen, M. Sredl, T. Jones y J. Longcore. 2002. Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife disease*. 38: 206-212.

Coloma, L. A., Guayasamin, J. M. & Menéndez-Guerrero, P. (eds). 2011–2012. Lista Roja de Anfibios de Ecuador. AnfibiosWebEcuador. Fundación Otonga, Quito, Ecuador. <<http://www.anfibioswebecuador.ec/listaroja.aspx>>.

Frank, I., R. Todeschini. 2006. *The Data Analysis Handbook*. Elsevier Science. 334-350.

Gallant, A. L., Klaver, R. W., Casper, G. S. and M. J. Lannoo. 2007. Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation. *Copeia* 4: 967–979.

Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., McKay, J. E. and Mendelson, J. R. III (eds). 2007. *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64pp

Goka K, Okabe K, Yoneda M, Niwa S (2001) Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*, 10, 2095–2099.

Heyer, R. W., M.A. Donnelly, R.W. Mc Diarmind, L.C. Hayek, y M.S. Foster. 1994. Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica. Métodos estandarizados para Anfibios. Smithsonian Institution Press. Edición En español: 2001. Editorial Universitaria de la Patagonia.

Jaeger, R.G. 1994. Transect Sampling. Pp 103-107 en Heyer, R.W., M.A. Donnelly, R.W. Mc Diarmind, L.C. Hayek, y M.S. Foster (Eds.) Measuring and Monitoring Biodiversity: Standard Methods for Amphibians, Smithsonian Institution Press. Washington D.C.

James TY., AP. Litvintseva, R. Vilgalys, JAT. Morgan, JW. Taylor, MC. Fisher, L. Berger, C. Weldon, L. Du Preez, and JE. Longcore. 2009. Rapid global extension of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. PlosPathogens 5.

Kiesecker, JM. 2011. Global stressors and global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. Ecological Restoration 26: 897-908.

Kilpatrick, AM., CJ. Briggs, P. Daszak. 2009. The Ecology and impact of Chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. Trends in Ecology and Evolution 25: 109-118.

Kruger, K., and J. Hero. 2006. Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. EcoHealth 3: 171-177.

LA MARCA, E. *et al.* 2005. Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frog (Bufonidae: Atelopus). Biotropica.

Lampo, M., S. Cesla, A. Rodríguez-Contreras, F. Rojas-Runjaic, and C. García. 2012. High turnover rates in remnant populations of the Harlequin frog *Atelopus cruciger* (Bufonidae): low risk of extinction? Biotropica 44: 420-426.

LIPS, K. 1998 Decline of a tropical montane amphibian fauna. Conservation Biology

LIPS, K. *et al.* 2005. Amphibian declines in Latin America: Widespread population declines extinctions and impacts. Biotropica

Longcore, J., A. Pessier, y D. Nichols. 1999. Batrachochytrium dendrobatidis gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91: 219-227.

LYNCH, J. y GRANT, T. 1998. Dying frogs in western Colombia: catastrophe or trivial observation? Revista académica Colombiana de Ciencias.

Menéndez-Guerrero, P. A. and Graham, C. H. (2013), Evaluating multiple causes of amphibian declines of Ecuador using geographical quantitative analyses. *Ecography*. doi: 10.1111/j.1600-0587.2012.07877.x

Morgan, JAT., V. Vredenburg, L. Rachowicz, R. Knapp, M. Stice, T. Tunstall, R. Blingham, JM. Parker, JE. Longcore, C. Moritz, CJ. Briggs, and J. Taylor. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PNAS* 104: 13845-13850

Pessier, A. 2002. An overview of amphibian skin disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11: 162-174.

Pessier A., D. Nichols, JE. Longcore, and MS Fuller. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*) *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 11: 194-199.

Piotrowski JS., Sa: Annis, and JE. Longcore, 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15.

PNAS.org. <http://www.pnas.org/content/105/44/17034/F1.expansion.html>

Pounds, A., M, Crump. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*

Pounds, J. *et al.* 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*

Pounds, A. 2001. Climate and amphibian declines. *Nature*

Quintero, M. 2008. Estimating infection level and vulnerability of Andean frog to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Trabajo de grado de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

Retallick, R., H. McCallum, and R. Speare. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLOS Biology* 2: 90-93.

Richmond, J., A. Savage, K. Zamudio, and E. Rosenblum. 2009. Toward immunogenetic studies of amphibian chytridiomycosis: linking innate and acquired immunity. *Bio science* 59: 311-320.

Rollins-Smith, LA.JP Ramsey, JD Pask, LK Reinert. DC Woodhams.2011.Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integrative and comparative biology* 51 (4): 552-562.

Ron, S. y A. Merino. 2000. Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog*

Ron, S. Duellman, W. Coloma, L. Bustamante, M. 2003. Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignesens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*

Ron, S. 2005. Predicting the distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*

Rosenblum, E., J. Voyles, T. Poorten, J. Stajich, 2010. The deadly chytrid fungus: a story of an emerging pathogen, *PLoS Pathogens* 6.

Salvador Figueras, M. (2001):"Análisis de conglomerados o cluster", [en línea] *5campus.org, Estadística* <<http://www.5campus.org/leccion/cluster>> [ingreso Julio, 9 de 2012]

Stuart, S. *et al.* 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/ecology>

Todeschini, R. 2003. Introducción alla Chemiometría. Edises, Universidad Milano Bicocca. 80-220.

Voyles, J., E. Rosenblum, L. Berger. 2011. Interaction between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian host: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection* 13: 25-32.

Wake, D., and V. Vredenburg. 2008. Are we in the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS* 105: 11466-11473.

Woodhams, DC., R. Alford, y G. Marantelli. 2003. Emerging disease of Amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of aquatic Organisms* 55: 65-67.

Woodhams, DC., VL Kilburn, LK. Reinert, J. Voyles, D. Medina, R. Ibañez, AD: Hyatt, DG. Boyle, JD: Pask, DM. Green, and LA. Rollins-Smith. 2008. Chytridiomycosis and amphibian declines continue to spread eastward in Panama. *Eco Health* 5: 268-274

Woodhams DC., RA. Alford, CJ: Briggs, M. Johnson, and LA. Rollins-Smith. 2008. Life history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology* 89: 1627-1639.

YOUNG, B. *et al.* 2001. Population declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology*

**Exploratory data analysis to develop conservation proposals for the Amphibian community in regard to *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Cajas* National Park, Cuenca-Ecuador.**

José F. Cáceres-Andrade

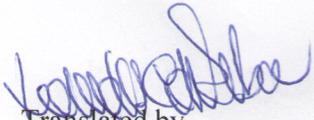
Biodiversity Program, Cajas National Park, Assistant Manager Office for Environmental Management, *ETAPA EP*. Cuenca-Ecuador

---

**ABSTRACT**

Amphibians are one of the most endangered species worldwide, even in protected or conservation areas. No one knows for sure what is the main factor that causes the decline or if several factors act and how in each case. One of the main ones is the occurrence of emerging diseases which have been responsible for extinction in several areas of the planet. With this study it is intended to link altitude, geographical position and the nine species registered in *Cajas* National Park (Azuay, Ecuador) with records of *Batrachochytrium dendrobatidis*.



  
Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo